

PCT/EP 01/08455



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

REC'D 10 SEP 2001

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

00116362.5

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 31/08/01
LA HAYE, LE

.

.

.

.

.

.

.



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°:

00116362.5

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt:

28/07/00

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
LIPONOVA GmbH
30625 Hannover
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Arzneimittel zur Immuntherapie maligner Tumoren

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04, // C12N5/08

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LU/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

This Page Blank (uspto)

Arzneimittel zur Immuntherapie maligner Tumoren

Gegenstand der vorliegenden Anmeldungen sind Zusammensetzungen, die sich insbesondere zur Immuntherapie maligner Tumoren eignen, sowie Verfahren zu deren Herstellung und die Verwendung der Zusammensetzungen zur Herstellung von Arzneimitteln.

Üblicherweise erfolgt die therapeutische Behandlung von Tumoren durch radikale Chirurgie, Chemo-, Radio- oder Hormontherapie. Diese Therapien haben zahlreiche unerwünschte Nebeneffekte und bringen erhebliche Belastungen für den Patienten mit sich. Überdies werden bei einigen Tumormformen mit diesen Therapien fast keine Verbesserungen erzielt, so dass deren Anwendung in Anbetracht der Nebenwirkungen nicht sinnvoll erscheint. Dazu zählen insbesondere maligne Tumoren, maligne Melanome, Nierenkarzinome, Darmkarzinome und pankreatische Karzinome. Daher liegt z. B. bei Nierenkarzinomen eine Sterblichkeitsrate von 85 % vor.

In den letzten Jahren wurden verstärkt Erkenntnisse über das komplexe Zusammenspiel zwischen Tumoren und dem Immunsystem gewonnen. Dabei rückten Strategien zur Behandlung von Tumoren in den Mittelpunkt des Interesses, bei denen das Immunsystem stimuliert wird. Im Allgemeinen ist es das Ziel solcher Therapien, zu erreichen, dass das Immunsystem spezifische Antigene von Tumorzellen erkennt, die bei gesunden Zellen nicht oder in geringeren Mengen vorhanden sind. Dies wird z. B. durch die Applikation eines Arzneimittels erreicht, wie es in Anticancer Research [(1997) Nr. 17, Seiten 2879 - 2882 und 3117 - 3120] beschrieben wird: Dabei wird einem Patienten

- 2 -

Tumorgewebe entnommen und zu einem autologen Tumorzellenlysat verarbeitet, welches dem Patienten injiziert wird. Dies geschah in der Erwartung, dass gegen die Tumorantigene im Lysat Immunität entsteht. Eine andere Strategie wird in der veröffentlichten Patentanmeldung WO/99/47687 beschrieben. Dort wird offenbart, dass Patienten autologe-Antigen präsäsentierende Zellen injiziert werden, die an ihren Oberflächen eine spezielle Tumordeterminante exprimieren.

Das Ziel von Tumorthapien ist es nicht nur, die Vergrößerung von Tumoren und die Bildung von Metastasen zu verhindern, sondern auch deren Rückbildung zu fördern. Die Lebenserwartung des Patienten soll erhöht und dessen Gesundheit und Lebensqualität verbessert werden. Über den Erfolg von Immuntherapien lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt feststellen, dass die bisherigen therapeutischen Behandlungen leider nur Einzelerfolge oder Teilerfolge erzielen können. Ein grundlegendes Problem ist dabei, dass viele Tumormarker in gewissen Differenzierungsstadien und in gewissen Mengen auch in gesunden Zellen vorhanden sind. Daher erfolgt die Aktivierung des Immunsystems gegen solche Tumormarker oft nicht in dem gewünschten Ausmaß oder mit der erforderlichen Spezifität.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Arzneimittel zur Tumorthapie zu entwickeln, die die oben genannten Ziele in hohem Maße erreichen. Tumorthapien sollten bei Verwendung der erfindungsgemäßen Arzneimittel auch relativ schnell und einfach durchführbar sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zur Immuntherapie von Tumoren. Die Zusammensetzung ist durch ein Verfahren erhältlich, in dem Tumormaterial bonitiert, zerkleinert und in eine gereinigte Zellsuspension überführt wird, die mit Interferon-gamma und Tocopherolacetat inkubiert und eingefroren wird, wodurch ein Tumorzellenlysat entsteht, und in dem Monozyten aus buffy coats oder aus Vollblut isoliert werden, die anschließend durch Inkubation mit Zytokinen zur Differenzierung zu dendritischen Zellen angeregt und

- 3 -

in das nichtadhärente Stadium überführt werden, wonach eine berechnete Menge des obigen eingefrorenen Tumorzelllysats aufgetaut wird, als Antigen zugesetzt wird, Zytokine zugesetzt werden, inkubiert wird und die entstandenen reifen dendritischen Zellen geerntet werden.

Unter der Bonitierung des Tumormaterials versteht man die makroskopische Beurteilung des Gewebes, nach der deutlich erkennbare Anteile an Fett-, Binde- und funktionalem Nierengewebe, Blutgefäße sowie weitere nicht-Tumorgewebe identifiziert und in der Folge entfernt und verworfen werden.

In einer besonderen Ausführungsform wird bei der Erzeugung der Zusammensetzung autologes Tumormaterial verwendet. Bei der Erzeugung der Zusammensetzung werden zur Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen bevorzugt IL-4 und GM-CSF und/oder IFN-gamma zugesetzt.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung eignet sich insbesondere als Arzneimittel oder zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immuntherapie. Arzneimittel, die das erfindungsgemäße Zelllysate beinhalten, werden bevorzugt intrakutan oder subkutan injiziert.

Mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel können alle denkbaren Arten von soliden Tumorerkrankungen behandelt werden. Insbesondere eignen sich Arzneimittel, die die erfindungsgemäße Zusammensetzung beinhalten, zur Behandlung von Tumoren, bei denen andere Behandlungsmethoden wenig erfolgreich sind. Dies sind insbesondere neben anderen malignen soliden Tumoren maligne Melanome, Nierenkarzinome, Darmkarzinome, pankreatische Karzinome, Lymphome, Bronchialkarzinome und gynäkologische Tumoren.

Bei der Behandlung von Patienten mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel im Rahmen einer Tumorthherapie wurden unerwartet ausgeprägte positive Effekte für die Patienten festgestellt. In überraschendem Ausmaße konnte das Wachstum von Tumoren und die Metastasenbildung verhindert werden, wäh-

rend die Rückbildung von Tumoren gefördert wurde. Die Gesundheit, die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Patienten wurde deutlich erhöht. Wahrscheinlich können diese Effekte erzielt werden, weil sich das erfindungsgemäße Arzneimittel in wesentlichen Aspekten von den bekannten unterscheidet. Ein besonderer Unterschied zu vielen bekannten Verfahren ist, dass dem Patienten nicht einfach Tumormarker appliziert werden, sondern dass diese in dendritischen Zellen als Vehikel direkt in das Immunsystem des Patienten eingeschleust werden. Überraschenderweise genügt es dabei, den dendritischen Zellen *in vitro* ein krudes Zelllysät aus Tumorzellen zuzuführen, während nach WOA99/47687 antigenpräsentierende Zellen mit einem gereinigten Antigen versetzt oder transfiziert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher auch schneller und einfacher durchführbar als bekannte Verfahren. Dies ist bei der Herstellung solcher Therapiestoffe von besonderer Bedeutung, damit die Gefahr von Kontaminationen gering gehalten wird. Des weiteren hat das Zelllysät den Vorteil, dass das gesamte Antigenrepertoire einer Tumorzelle verfügbar ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, bei denen eine Suspension von Tumorzellen hergestellt wird, die Tumorzellen abgetötet werden und bei dem Monozyten aus Blut isoliert werden, deren Differenzierung zu dendritischen Zellen induziert wird und die so gewonnenen "unreifen" dendritischen Zellen mit dem Zelllysät der abgetöteten Tumorzellen inkubiert werden, die Reifung der dendritischen Zellen induziert wird und die "reifen" dendritischen Zellen geerntet werden.

Die Monozyten werden dabei bevorzugt aus buffy coats, aus Stammzellseparation, aus Leukaphereseprodukten oder aus Vollblut isoliert. Die Differenzierung der Monozyten zu "unreifen" dendritischen Zellen wird bevorzugt durch Zytokine, IL-4 und GM-CSF induziert. Zur Induktion der Reifung von "unreifen" zu "reifen" dendritischen Zellen eignen sich insbesondere Prostaglandin E2 und TNF- α und/oder IL-1 β und IL-6 zusätzlich zu IL-4 und GM-CSF. Die Herstellung der Tumorzellsuspension erfolgt im Allgemeinen

- 5 -

durch Isolierung von Tumormaterial, welches gegebenenfalls bonitiert, zerkleinert und in eine gereinigte Zellsuspension überführt wird. In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Suspension von Tumorzellen aus autologem Tumormaterial hergestellt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird in der Tumorzellsuspension vor dem Abtöten der Tumorzellen die Expression von membranständigen Proteinkomplexen induziert. Die Induktion erfolgt bevorzugt durch Interferon-gamma und Tocopherolacetat. Das Abtöten der Tumorzellen erfolgt insbesondere durch Einfrieren. Das Ernten der reifen dendritischen Zellen erfolgt bevorzugt bei Vorliegen typischer morphologischer Merkmale (z. B. Segelbildung), beurteilt durch mikroskopische Kontrolle und/oder durch Charakterisierung von Oberflächenantigenen mittels fluoreszierenden Antikörpern. Inhalt der Erfindung ist auch die Verwendung der beschriebenen Zusammensetzung und ihre möglichen Ausführungsformen zur Herstellung von Arzneimitteln zur Tumorthherapie.

Die beschriebene Zusammensetzung und ihre möglichen Ausführungsformen werden erfindungsgemäß auch zur Herstellung von Arzneimitteln zur Tumoringpfung verwendet.

Ausführungsbeispiel

Herstellung einer Zusammensetzung zur Tumorthherapie

A) Herstellung eines Tumorzelllysats

Zur Präparation des Tumorgewebes werden makroskopisch deutlich erkennbare Anteile an nicht-Tumorgewebe wie Fett-, Binde- und funktionale Nierengewebe sowie Blutgefäße und nekrotisches Gewebe sorgsam entfernt und verworfen. Das fertig präparierte Gewebe wird so klein wie möglich zerteilt (Stückchen mit etwa 2-3 mm Durchmesser) und/oder herausgeschält und anschließend mit dem umgebenden Medium in ein steriles Sieb (50-100 mesh)

überführt. Mit dem Glasstab werden alle im Sieb befindlichen Gewebestückchen unter langsamen Rühren ohne Druck durchpassiert. Die durchgetretenen Zellen werden mit dem Medium (RPMI 1640) in ein steriles Becherglas überführt und die Gewebereste im Sieb erneut nach Zugabe von 15 ml RPMI-Medium (RPMI 1640 mit 25 mmol HEPES) mit dem Glasstab passiert.

Die Zellsuspension wird auf 45% Percollkissen aufgeschichtet. Dieser Schritt dient zur Entfernung eventuell vorhandener Erythrozyten und zur Anreicherung von mononukleären Zellen auf dem Percollkissen. Die befüllten Röhrchen werden zentrifugiert, und die Interphase mit den mononukleären Zellen wird abgesaugt, in ein Röhrchen überführt, abzentrifugiert und mit NaCl-/Glucoselösung gewaschen. Die Gesamtzahl vitaler Zellen wird mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt. Außerdem wird eine Zelltypisierung durchgeführt mit Testsimplents® (Boehringer, Mannheim), die sich eignen, Karzinomzellen in einem schnellen Färbeverfahren von anderen Zellen unterscheidbar zu machen. Nach Resuspension der Zellen in Natriumchlorid/Glucoselösung wird Vitamin E (700 µg/herzustellender Dosis) und Interferon-gamma (1500 I.E./herzustellender Dosis) zugegeben. Der Ansatz wird im Wasserbad zwei Stunden bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und zweifach mit Natriumchlorid/Glucoselösung gewaschen. Der Ansatz wird in Kryoröhrchen aliquotiert und durch Einfrieren bei -85°C bis $\pm 5^\circ\text{C}$ in ein Tumorzelllysät überführt. Die Qualitätskontrollen umfassen die Prüfungen gemäß der Spezifikation auf Zellzahl, Sterilität und Devitalisierung.

B) Herstellung der dendritischen Zellen und der Zusammensetzung zur Tumorthherapie

Verwendete Medien:

Medium A: RPMI-Medium + 1 % autologes Plasma

Medium B: Medium A + GM-CSF (800 U/ml) + IL-4 (1000 U/ml)

- 7 -

Medium C: Medium B + TNF- α (1000 U/ml) + Prostaglandin E₂ (1 μ g/ml)

Die buffycoats aus freigegebenen Blutspenden, aus Leukapheresen oder Vollblut aus dem Blutbeutel werden in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Die Interphase enthält die mononukleären Zellen (= buffy coat) und wird von den Erythrozyten (unten) und dem Plasma (oben) abgetrennt. Plasma und mononukleäre Zellen werden auf Lymphoprep® (Nycomed) aufgeschichtet und zentrifugiert. Anschließend werden Plasma und mononukleäre Zellen abpipettiert und erneut zentrifugiert. Das Plasma wird abgenommen und für den Ansatz der Medien verwendet. Restliches Plasma wird bei + 2°C bis + 8°C aufbewahrt, um eventuell zusätzliches Medium A herzustellen. Das Zellsediment wird mit NaCl-Lösung (0,9 %) zweimal gewaschen und zentrifugiert. Vor dem zweiten Waschschrift werden vitale Zellen nach Färbung mit Trypanblau gezählt. Der Zentrifugationsrückstand wird in einer Zellkonzentration von 4×10^6 /ml in Medium A aufgenommen. Die Zellsuspension wird auf Petrischalen aufgebracht und für zwei Stunden bei 37 °C +/- 1°C/5 % CO₂ inkubiert. Es erfolgt mikroskopische Kontrolle auf adhärenente Zellen (Monozyten), wonach Medium A vorsichtig abgesaugt wird, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Zu den Petrischalen wird Medium B gegeben und bei 37°C +/- 1°C/5 % CO₂ inkubiert. Am Tag 1 wird Medium B abgesaugt und frisches Medium hinzugefügt. Am Tag 2 wird Medium B partiell (3 ml) abgesaugt und frisches Medium B (3 ml) hinzugefügt. Am Tag 5 erfolgt mikroskopische Kontrolle, ob adhärenente Zellen in das nicht-adhärenente Stadium übergegangen sind. Die Zellen eines Ansatzes werden vereinigt und vitale Zellen nach Färbung mit Trypanblau gezählt. Die Zellen werden abzentrifugiert und in einer berechneten Menge (5×10^5 /well/3 ml) in Medium C aufgenommen, wobei das Volumen einem Zehntel des Endvolumens entspricht, mit einer berechneten Menge Tumorzelllysate (5×10^4 /well/3ml) versetzt, homogenisiert und für eine Stunde bei 37°C +/- 1°C/5 % CO₂ inkubiert, wonach auf das Endvolumen mit Medium C aufgefüllt wird. Die Zellsuspension wird auf 6-well-Platten

- 8 -

ausplattiert und weiter bei 37°C +/- 1°C/5 % CO₂ inkubiert. An Tag 6 und 7 erfolgt mikroskopische Kontrolle: der Reifungsprozess der dendritischen Zellen deutet sich durch "Segelbildung" an. Am Tag 8 erfolgt bei ausgeprägter "Segelbildung" bei mikroskopischer Kontrolle das "Ernten" der reifen dendritischen Zellen. Die reifen dendritischen Zellen werden zentrifugiert und zweimal gewaschen. Der Zentrifugationsrückstand wird in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen, vitale Zellen werden nach Färbung mit Trypanblau gezählt und mit 0,9 % NaCl-Lösung auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung erhältlich durch ein Verfahren, in dem Tumormaterial bonitiert, zerkleinert und in eine gereinigte Zellsuspension überführt wird, die mit Interferon gamma und Tocopherolacetat inkubiert und eingefroren wird, wodurch ein Tumorzelllysate entsteht,

und in dem Monozyten aus buffy coats oder aus Vollblut isoliert werden, die anschließend durch Inkubation mit Zytokinen zur Differenzierung zu dendritischen Zellen angeregt und in das nichtadhärente Stadium überführt werden,

wonach eine berechnete Menge des obigen eingefrorenen Tumorzelllysates aufgetaut wird, als Antigen zugesetzt wird, Zytokine zugesetzt werden, inkubiert wird und die entstandenen reifen dendritischen Zellen geerntet werden.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, bei deren Erzeugung autologes Tumormaterial verwendet wird.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, bei deren Erzeugung zur Differenzierung zu "unreifen" dendritischen Zellen IL-4 und GM-CSF zugesetzt werden.
4. Arzneimittel, enthaltend eine Zusammensetzung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 3.
5. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, bei dem eine Tumorzellsuspension hergestellt wird, die Tumorzellen abgetötet werden,

- 10 -

und bei dem Monozyten aus Blut isoliert werden, deren Differenzierung zu dendritischen Zellen induziert wird,

und die so gewonnenen "unreifen" dendritischen Zellen mit dem Zell-
lysat der abgetöteten Tumorzellen inkubiert werden, die Reifung der
dendritischen Zellen induziert wird und die "reifen" dendritischen Zellen
geerntet werden.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die Monozyten aus buffy coats, Vollblut, Leukapherese oder Stammzellseparation isoliert werden.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5 und/oder 6, bei dem die Differenzierung der Monozyten zu "unreifen" dendritischen Zellen durch Zytokine, IL-4, und GM-CSF mit oder ohne Interferon-gamma induziert wird.
8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 - 7, bei dem die Reifung von "unreifen" zu "reifen" dendritischen Zellen durch Prostaglandin E_2 und TNF- α und/oder mit IL-1 und IL-6 zusätzlich zu IL-4 und GM-CSF induziert wird.
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 - 8, bei dem die Tumorzellensuspension hergestellt wird, indem Tumormaterial isoliert und gegebenenfalls bonitiert, zerkleinert und in eine gereinigte Zellsuspension überführt wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 - 9, bei dem die Tumorzellensuspension hergestellt wird, indem autologes Tumormaterial isoliert und gegebenenfalls bonitiert, zerkleinert und in eine gereinigte Zellsuspension überführt wird.

Printed: 31-08-2001

SPEC

00116362

- 11 -

11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 - 10, bei dem vor dem Abtöten der Tumorzellen in der Tumorzellensuspension die Expression von membranständigen Proteinkomplexen induziert wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem die Expression von membranständigen Proteinkomplexen durch Interferon-gamma und Tocopherolacetat induziert wird.
13. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die Tumorzellen durch Einfrieren abgetötet werden.
14. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die "reifen" dendritischen Zellen bei Vorliegen typischer morphologischer Merkmale (z. B. Segelbildung), beurteilt durch mikroskopische Kontrolle, und/oder durch Charakterisierung von Oberflächenantigenen mittels fluoreszierenden Antikörpern geerntet werden.
15. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Tumorthherapie.
16. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Tumorumpfung.

Printed: 31-08-2001

25-07-00 14:12 : +49 221 134287-
SPEC

+49 89 23891407
00116

- 12, -

Zusammenfassung

Inhalt der vorliegenden Erfindung ist eine Zusammensetzung, verwendbar als Arzneimittel oder zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immuntherapie von Tumoren oder zur Tumorigmpfung.

Die Erfindung umfasst auch Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Immuntherapie von Tumoren oder zur Tumorigmpfung.